

## 9. Nanovacunas

SARA VICENTE, ALEJANDRO SÁNCHEZ Y  
MARÍA JOSÉ ALONSO

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad  
de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.*

### BREVE HISTORIA SOBRE LA VACUNACIÓN

La vacunación es una de las intervenciones médicas más efectivas y seguras actualmente. Desde su descubrimiento, las vacunas son el mejor medio para prevenir enfermedades, y se considera que han llegado a ser el mayor logro en salud pública de todos los tiempos junto con los antibióticos y las mejoras de higiene en la población, contribuyendo enormemente a la reducción de la morbilidad y mortalidad debida a enfermedades infecciosas.



FIGURA 9.1. Lámina que ilustra el inicio de la vacunación frente a la viruela por Jenner en el siglo XVIII.

La viruela ha sido la primera enfermedad infecciosa que se ha tratado de prevenir hace ya más de mil años en la Antigua China. Entre otros métodos, se utilizaban las costras y/o secreciones desecadas y convertidas en polvo de un paciente con viruela para inmunizar contra la enfermedad. Se administraba insuflando el polvo en las fosas nasales con la finalidad de crear inmunidad tras repetidas exposiciones, de forma absolutamente intuitiva.

La primera evidencia científica en el intento de proteger a la población frente a la viruela aparece a finales del siglo XVIII gracias a Edward Jenner. Éste había observado como las lecheras que previamente habían contraído la viruela bovina, no llegaban a desarrollar la variante humana de la enfermedad. Inoculando las costras tomadas de las vacas infectadas y previamente procesadas, administraba los microorganismos *atenuados*, es decir, la variante menos virulenta de la enfermedad. Y aunque nunca obtuvo la vacuna de forma experimental, fue el primero en utilizar el concepto de atenuación para conseguir vacunas frente a un patógeno, muy diferente a la utilizada más adelante por Louis Pasteur.

Pasteur redefine el término *atenuación* referido a vacunas, ya que a diferencia de Jenner, él utilizaba el mismo agente causal de la enfermedad para generar la vacuna. Hace este descubrimiento de forma casual cuando se olvida un cultivo de *Pasteurella multocida* (agente causal del cólera del pollo) y observa que al inocularlo a los pollos, éstos se protegían frente a la enfermedad. Del mismo modo, continuó aplicando el mismo concepto a otras vacunas frente al ántrax o la rabia. Las técnicas de atenuación basadas en los descubrimientos de Pasteur han ido mejorando con el tiempo de forma que se han ido obteniendo vacunas cada vez más puras, debido a los grandes avances en cuanto a cultivos celulares que permitieron el mejor aislamiento y cultivo del patógeno causante de la enfermedad, y la posterior atenuación del mismo usando diferente métodos, de forma que se logra menguar la actividad del microorganismo manteniendo su inmunogenicidad.

La carrera por profundizar en la investigación de nuevas vacunas y nuevas formas de inmunización más seguras y eficaces comienza ya en el momento en el que se describen los múltiples riesgos asociados a la inmunización con patógenos vivos atenuados (reactivación del microorganismo, reacciones anafilácticas, etc.). Así, ya en la segunda mitad del siglo XIX, se establece en Estados Unidos el concepto de vacuna compuesta por el microorganismo completamente desactivado ó muerto. Edmun Salmon y Theobald Smith, desarrollaron la primera vacuna desactivada con calor contra el cólera del cerdo, y a partir de ahí se generaron de este modo una lista de vacunas desactivadas hasta nuestros días, entre las que se encuentra por ejemplo las vacunas contra el cólera humano y la peste.

A principios del siglo XX se descubre la inmunogenicidad provocada por las toxinas generadas por las bacterias de la difteria y el tétanos químicamente inactivadas, es decir, aparecen los primeros toxoides. A partir de este descubrimiento se comienza la búsqueda de subunidades de organismos patógenos que pudiesen generar inmunogenicidad sin tener que administrar el microorganismo completo al paciente.

Es entre los años 70 y 80 cuando tiene lugar la aparición de las primeras vacunas formadas por las subunidades más inmunogénicas y conservadas del patógeno, como fracciones polisacáridicas o proteínas purificadas. La primera vacuna de este tipo, contra *Haemophilus influenzae* tipo b, compuesta por un conjugado de proteína y un polisacárido de la cápside del virus, fue aprobada en 1985 (1).

Paralelamente a estos importantes avances, comienza el gran desarrollo de las nuevas técnicas de ingeniería genética. Se comienza a investigar en profundidad para identificar y aislar los componentes más inmunogénicos y conservados de los microorganismos, así como el desarrollo de nuevas técnicas la atenuación racional mediante mutación directa del genoma de patógenos, eliminando las fracciones más virulentas y generando microorganismos apatógenos. Es así como en 1986, Merck comercializa la primera vacuna recombinante de la hepatitis B, obtenida en cultivos de levaduras mediante la técnica de ADN recombinante.

Por otro lado, la técnica del ADN recombinante ha servido para diseñar plásmidos ADN que contengan una secuencia codificadora de un antígeno para lograr respuestas inmunológicas, como recientemente ha sido recogido en la revisión de Liu y col. (2). El mecanismo de presentación del antígeno en este caso, imitaría a la forma natural de presentación de los antígenos víricos. De igual forma que si se consigue la liberación del plásmido vacuna en el interior de la célula, el virus internaliza en la célula su material genético, que se traduce a las proteínas víricas gracias a la maquinaria celular. Estos antígenos serían procesados y presentados luego por las células presentadoras de antígeno (CPA) por el mismo mecanismo que los antígenos víricos.

La secuenciación del genoma de los diferentes patógenos también ha contribuido de forma importante a la identificación de nuevos antígenos y factores de protección, a lo que se denomina vacunología reversa (3).

Como vemos, desde los descubrimientos de Pasteur en cuanto a la atenuación de microorganismos para generar protección inmunológica frente a enfermedades infecciosas, el desarrollo de vacunas hasta nuestros días se ha basado en mejorar su perfil de seguridad mediante (a) la purificación exhaustiva de vacunas

atenuadas o desactivadas para minimizar reacciones adversas asociadas, (b) mejorando las técnicas de atenuación mediante mutaciones racionales para evitar reactivación de los microorganismos atenuados administrados y mediante (c) la búsqueda y expresión de nuevos antígenos subunidad, así como el diseño de plásmidos mediante las técnicas más avanzadas de ingeniería genética. Siempre se ha tratado de mejorar el perfil de seguridad de las vacunas para evitar los riesgos asociados a la inmunización, pero al mismo tiempo se trata también de conseguir que la inmunogenicidad de estas nuevas vacunas sea la adecuada para dar lugar a vacunas eficaces que protejan a la mayoría de la población. Asimismo, se están haciendo grandes avances para lograr que la respuesta inmune generada sea la adecuada en función del patógeno contra el que se está protegiendo y de las nuevas aplicaciones de las vacunas para el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas y del cáncer, denominadas vacunas terapéuticas (4). Existe cada vez más la necesidad de modular la respuesta inmune en función de este objetivo final, de forma que se están investigando nuevos adyuvantes y sistemas de liberación de vacunas para intentar polarizar, en este caso, la respuesta inmune hacia la generación de respuestas celulares específicas frente a patógenos intracelulares o marcadores antigénicos específicos de células tumorales.

Por ello sería importante durante el diseño de una nueva vacuna, tener en mente una serie de aspectos básicos, de forma que aplicando dichos conocimientos se llegue a una vacuna final que cumpla los requisitos de seguridad y eficacia así como para enfocarla a su aplicación final. Según describe Bramwell y col. (5) el diseño de una vacuna se basaría fundamentalmente en tres puntos:

- Identificación y producción de antígenos recombinantes o material genético que presenten buenas características para generar respuestas inmunes específicas frente a la infección en cuestión.
- Conocer el comportamiento del agente patógeno cuando entra en contacto con el organismo y los consecuentes procesos que darán lugar a la generación de la respuesta inmune, de forma que se pudiese imitar dicho comportamiento para conseguir una respuesta inmunológica más adecuada a cada patógeno.
- Utilización de diferentes estrategias para aumentar y modular la respuesta inmunológica de forma que se debe tener un amplio conocimiento de los mecanismos de acción de los adyuvantes o sistemas de liberación.

Actualmente el enfoque en el desarrollo de nuevas vacunas se centra en incrementar su seguridad y aumentar la confianza de la población mediante la aplicación nuevas tecnologías que mejoren la administración de antígenos y la bús-

queda de nuevos marcadores antigénicos y adyuvantes adecuados para evitar las reacciones adversas derivadas de la inmunización, pero al mismo tiempo manteniendo la eficacia de protección conseguida con las vacunas clásicas. De este modo se pretende facilitar la administración de las vacunas con el fin de mejorar el cumplimiento en las pautas de inmunización y para que los calendarios y campañas de vacunación sean más sencillos. De modo que la mayor parte de la población se encuentre protegida y se llegue a controlar y minimizar la propagación de enfermedades infecciosas con el consecuente beneficio en la salud pública mundial (6).

## NECESIDAD DE NUEVAS VACUNAS

En general, las vacunas disponibles en el mercado y que se están utilizando actualmente, presentan un perfil de seguridad envidiable, sobre todo teniendo en cuenta que cualquier intervención médica lleva siempre asociado un cierto riesgo. Sin embargo, las vacunas se administran normalmente a población sana, y en especial a niños, con lo cual cualquier posible reacción adversa que pueda asociarse a la inmunización va a tener un gran impacto (7). Actualmente, en términos globales, la población que se está protegiendo supera con creces a los casos esporádicos identificados de reacciones adversas. Es por ello que las vacunas continúan contribuyendo de forma crucial a la reducción de la morbilidad y la mortalidad debidas a enfermedades infecciosas.

La preocupación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) por la seguridad tanto en los calendarios de vacunación ya establecidos como en las campañas de vacunación ocasionales, ha derivado a que se lleven a cabo nuevas estrategias de control que aseguren la calidad del producto durante su fabricación y mejoren la vigilancia tras su comercialización para poder detectar posibles efectos adversos y así, poder actuar de forma rápida y eficaz frente a la posible aparición de reacciones adversas esporádicas. Del mismo modo, grandes esfuerzos se centran en promover y apoyar la investigación y el desarrollo de métodos de liberación y administración más eficientes mediante el uso de nuevas tecnologías (8). Existe por tanto, una gran necesidad de desarrollar nuevas vacunas que se acerquen cada vez al tópico de «vacuna ideal» (Tabla 9.1) con la finalidad última de aumentar la cobertura inmunológica de la población.

Se están invirtiendo grandes esfuerzos para conseguir este objetivo siguiendo diferentes vías. Por un lado, mediante la búsqueda e identificación de nuevos antígenos (3) o mediante el diseño de vacunas basadas en plásmidos ADN (9) capaces de generar respuestas inmunes específicas sin la nece-

TABLA 9.1. *Resumen de las características que reuniría una «vacuna ideal» y las consecuencias que supondría cada una de ellas para conseguir el objetivo final.*

Características de la vacuna	Implicaciones	Objetivo final
Segura	Evitar riesgos de contagio de patógenos transmitidos a través de fluidos biológicos. Disminución de la carga de desechos derivados de la inmunización.	
Efectiva	Minimizar la variabilidad paciente-paciente. Conseguir nivel máximo de protección.	Ampliar la cobertura inmunológica en la población
Tecnología sencilla	Más barata y más rápida de producir.	
Fácil administración	Evitar la presencia de personal sanitario especializado para la administración. Posibilidad de vacunaciones masivas en casos de epidemia/pandemia.	
Barata	Fácilmente adquirible cualquier país del mundo.	
Termoestable	Evita la pérdida de efectividad por variaciones de temperatura.	
De fácil aceptación por el paciente, cómoda y bien tolerada	Mejora en el cumplimiento de las pautas de inmunización. Vacunación más efectiva.	
Disminución del número de dosis administradas: vacunas de dosis única o vacunas múltiples.	Mejora en el cumplimiento de las pautas de inmunización. Vacunación más efectiva.	
Evitar la necesidad de personal cualificado para la administración.	Economiza las campañas de vacunación. Posibilidad de vacunas auto-administradas por el paciente.	

sidad de administrar el microorganismo atenuado. Y por otro lado, para mejorar la cobertura inmunológica, también se pueden realizar importantes mejoras en la propia formulación de las vacunas ya existentes pero que todavía resultan poco eficaces frente a la enfermedad que se quiere proteger. Por tanto, se trata de encontrar el modo de optimizar y modular la respuesta inmune alcanzada en función del patógeno diana y su aplicación final, de modo que la formulación sea la más adecuada en caso de tratarse de una vacuna preventiva o terapéutica.

## **MEJORAR EL ACCESO A VACUNAS EN LA POBLACIÓN**

Es igualmente de enorme importancia, mejorar el acceso a las vacunas en la población global con el fin de aumentar la cobertura inmunológica frente a enfermedades infecciosas. En general, el acceso a vacunas en países industrializados no es un problema, sin embargo, en el caso de países en vías de desarrollo existe una gran problemática relacionada con la baja accesibilidad de la población general a las campañas de vacunación debido a la falta de financiación, deficiencias en las infraestructuras de inmunización y barreras logísticas en la distribución a áreas remotas, principalmente (10). Los pilares básicos para comenzar a solventar la problemática relacionada con el acceso a la vacunación en países pobres y también para poder aumentar la confianza en la vacunación de la población de los países industrializados se resumen en: (a) conseguir una liberación del antígeno más fácil y segura mediante su administración a través de vías no invasivas que no requieran inyección, (b) disminución de la dependencia de la cadena de frío con vacunas termoestables, (c) minimizar el número de intervenciones con vacunas de dosificación única o vacunas múltiples.

### **Utilización no segura de agujas necesarias para la administración parenteral de vacunas**

El simple hecho de inmunizar está generando al mismo tiempo un aumento del riesgo en la transmisión de patógenos como el VIH o el VHB, los cuales se transmiten a través de fluidos biológicos (11). Es especialmente significativo en países en vías de desarrollo, el uso no seguro del material de inmunización (agujas y jeringas) debido principalmente a su reutilización y al manejo en condiciones no estériles de los viales multidosis conteniendo la vacuna. Este es un importante foco de contagio de enfermedades transmitidas a través de fluidos biológicos, dando lugar a un aumento del riesgo de transmisión tanto del paciente como del personal sanitario, al mismo tiempo que se favorece la propagación de este tipo de enfermedades infecciosas durante el proceso de inmunización (12). Por otro lado, se generan residuos peligrosos derivados del uso de agujas y jeringas para la administración que no siempre son adecuadamente tratados y eliminados (13). Sería por tanto muy interesante el desarrollo de nuevas tecnologías mediante el diseño de sistemas de liberación de vacunas sin agujas para mejorar la seguridad durante la inmunización, disminuir la problemática derivada de los deshechos asociados, al mismo tiempo que se mejoraría la aceptación por parte del paciente y se reducirían los costes ligados a la vacunación al utilizar tecnologías y modos de administración más sencillos (14).

## **Termoestabilidad**

A pesar de la concienciación de la necesidad de mantener la cadena de frío es muy frecuente que se produzcan deficiencias relacionadas principalmente con la exposición temporal a altas temperaturas durante el transporte o almacenamiento, o por congelación, debido a un exceso de refrigeración (15). Son especialmente sensibles aquellas vacunas cuyo adyuvante es el  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (16), ya que su estructura particulada se destruye tras la congelación. La pérdida de potencia de las vacunas es la consecuencia fundamental de una deficiencia en la cadena de frío que frecuentemente puede pasar inadvertida. De esta forma, los pacientes que reciban estas vacunas, probablemente no se estarán protegiendo adecuadamente. Por lo tanto, mejorando la estabilidad de las vacunas a diferentes temperaturas para evitar la cadena de frío, se garantizará el acceso a vacunas en estado óptimo especialmente en áreas remotas en países del tercer mundo donde es habitual la falta de electricidad y por tanto, difícil mantener la refrigeración (17).

## **Dosificación múltiple**

La mayoría de las vacunas, y especialmente los nuevos antígenos recombinantes, necesitan de varias dosis de recuerdo para poder alcanzar un nivel de protección adecuado. Junto con esto, la necesidad de administrar un alto número de vacunas para proteger frente a una gran variedad de patógenos, son las principales razones por las que solo mediante la vacunación se administren un altísimo número de dosis mediante inyección (14). En general, debido a esto, las pautas de inmunización no siempre se cumplen, de forma que pacientes que no reciben la dosificación correcta no llegan a generar una protección adecuada, y estarían igualmente expuestos a infecciones. Alternativas para solventar esta limitación se relacionan principalmente con la posibilidad de administrar vacunas que requieran de una única dosis, capaz de alcanzar los niveles de protección sin recurrir a las dosis de recuerdo, o mediante la vacunación múltiple, es decir, administrar varios tipos de antígenos para proteger frente a varias enfermedades en una sola vacuna (18).

Por tanto, para evitar la problemática relacionada con la vacunación actual y aumentar la cobertura inmunológica de la población, se debe tratar de investigar nuevas alternativas mediante la introducción de nuevas tecnologías que permitan realizar campañas de inmunización más seguras y al mismo tiempo aumenten la confianza de la población en la vacunación, fundamentalmente (12).

## **Nuevas formulaciones de vacunas basadas en el uso de inmunomoduladores y potenciadores de la respuesta inmune**

Las vacunas clásicas basadas en microorganismos atenuados o muertos han sido utilizadas desde los tiempos de Jenner hasta nuestros días. Sin embargo, ya se ha visto que éstas pueden ir acompañadas de cierta problemática relacionada con la posible reactivación del agente infeccioso como consecuencia de mutaciones en el genoma, así como la presencia de agentes tóxicos que pueden acompañar al patógeno, como son los lipopolisacáridos (LPS) o por la pérdida de potencia debido a deficiencias en el transporte y almacenamiento en las condiciones refrigeración requeridas. Sin embargo, la mayor purificación de las vacunas que se ha conseguido en los últimos años gracias a los importantes avances en el campo de la biotecnología que permite la obtención de antígenos recombinantes, o plásmidos ADN codificadores de antígenos, aumentan de forma importante la seguridad de las vacunas, pero a cambio, la mejora en la seguridad también suele conllevar una disminución en la inmunogenicidad de la vacuna.

La menor potencia de la respuesta inmune lograda tanto con los antígenos recombinantes como con las vacunas ADN hace que sea necesario, en general, el apoyo con algún tipo de adyuvante, de forma que ayude a incrementar la respuesta inmunitaria sobre el antígeno/material genético administrado, especialmente si se pretende desarrollar un sistema de vacunación a través de una vía mucosa.

Actualmente existen una amplia variedad de adyuvantes en estudio como son los toxoides bacterianos, las emulsiones, sustancias inmunoestimulantes, y cada vez más, los sistemas de liberación de antígenos se consideran sistemas adyuvantes (19, 20). Sin embargo el más ampliamente utilizado y todavía el único aprobado para su uso en la elaboración de vacunas en Estados Unidos, son las sales insolubles de aluminio, más conocidas como álum (21). Hasta el momento, el álum ha demostrado que puede ayudar a generar respuestas inmunológicas importantes al administrarse con el antígeno por vía parenteral, y al mismo tiempo es considerado un adyuvante aceptablemente seguro desde el momento de su descubrimiento, en los años 20. A pesar de ello, el álum presenta ciertos inconvenientes relacionados principalmente con la aparición de síntomas locales tras la inyección, como hinchazón, eritemas o nódulos cutáneos, que pueden durar incluso varias semanas. Básicamente se manejan dos hipótesis a la hora de explicar la sintomatología producida por el álum, y es que puede actuar como reservorio del antígeno o formar un foco inflamatorio de atrac-

ción de células inmunocompetentes como consecuencia del efecto depot o como característica propia del compuesto (22). Por otro lado, otra importante desventaja de este adyuvante se relaciona con su inestabilidad tras la congelación debido a la destrucción del gel a 0 °C provocando una disminución en la potencia de la vacuna (16). La respuesta inmunológica alcanzada con este adyuvante presenta un perfil bastante limitado al estimular la producción de citoquinas que favorecen principalmente la proliferación de linfocitos Th2 y la inducción de una respuesta humoral. Otra limitación de este adyuvante tiene que ver con la generación de IgE, inmunoglobulina que media en las respuestas alérgicas (22).

Sin embargo, a pesar de que el *alum* es el único adyuvante aprobado para su uso en humanos, actualmente se están invirtiendo grandes esfuerzos en la búsqueda de nuevos adyuvantes más eficaces y seguros, es decir, adyuvantes que permitan modular la respuesta inmune en función de las características del patógeno y que al mismo tiempo presente un perfil de seguridad mejor que el *alum*. Por ejemplo, recientemente ha sido introducido en el mercado europeo un nuevo adyuvante, consistente en un sistema de liberación particulado, la microemulsión MF59<sup>TM</sup>. En 1997 se aprobó en Italia para ser utilizado conjuntamente con la vacuna de la gripe (Fluad<sup>TM</sup>), y posteriormente se ha ido introduciendo en el resto de países de la Unión Europea por reconocimiento mutuo, debido a sus buenas características de seguridad y eficacia demostradas a lo largo de estos años en distintos estudios clínicos (23).

## **INTRODUCCIÓN DE LAS NANOTECNOLOGÍAS EN EL DESARROLLO DE VACUNAS**

En los últimos años, el desarrollo de sistemas de liberación de vacunas ha sido ampliamente investigado. Liposomas, micropartículas, emulsiones y más recientemente nanopartículas, han sido objeto de investigación como sistemas de liberación de vacunas que podrían mejorar la inmunogenicidad de los nuevos antígenos recombinantes y además permitirían la administración a través de vías no invasivas, como la vía mucosa o la liberación transdérmica, ayudando a mejorar la cobertura inmunológica (24, 25).

En general, los sistemas de liberación consisten en sistemas particulados que promueven la captación del antígeno por las células presentadoras de antígeno (CPA) favoreciendo su reconocimiento para que de este modo, el antígeno sea liberado al sistema inmune de una forma más eficiente (20). Al mismo tiempo se puede aumentar la inmunogenicidad del antígeno asociado mediante la incorporación de algún tipo de adyuvante para ser liberado simultáneamente,

bien para aumentar su potencia, o bien para modular la respuesta inmune y dar lugar a respuestas celulares si se trata de una vacuna frente a patógenos víricos intracelulares o vacunas terapéuticas (26).

Ya a finales de los años 70, los sistemas poliméricos basados en microsferas comienzan a utilizarse como potenciales sistemas de liberación y transportadores de antígenos, con la finalidad de obtener un sistema de vacunación adecuado para la inmunización en dosis única (27). El importante desarrollo en la utilización de microsferas poliméricas biodegradables a partir de ese momento se debió en gran medida al interés mostrado por la industria química y farmacéutica en estos sistemas. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) proponía las microsferas de PLGA como una forma para mejorar la cobertura inmunológica, así como para reducir los costes asociados a la vacunación (28). A partir de ese momento, la utilización de microsferas elaboradas a partir de este biomaterial ha sido ampliamente estudiado para la liberación de vacunas y contribuir a la inducción de la respuesta inmune específica frente al antígeno asociado a través de diferentes vías de administración (29-34).

Ya más recientemente, el uso de las nanopartículas poliméricas para la liberación de vacunas ha comenzado a destacar como una posible estrategia para desarrollar nuevas vacunas (35). Las buenas características de estos nuevos sistemas de liberación poliméricos serán descritos en los siguientes apartados.

### **Nanopartículas poliméricas para la liberación de vacunas**

Las nanopartículas son estructuras de tamaño nanométrico formadas a partir de diversos materiales capaces de asociar una molécula bioactiva. Una importante característica de estos sistemas es su mayor capacidad de captación por las células comparado con estructuras de mayor tamaño.

Existen una amplia variedad de nanosistemas diferenciados por los materiales utilizados para su elaboración y/o método de preparación, de forma que, de forma resumida, pueden distinguirse en nanosferas, nanocápsulas, liposomas, micelas poliméricas y dendrímeros (41). Dichos sistemas presentan propiedades que pueden ser empleadas para mejorar la liberación de fármacos, proteínas, genes y vacunas (Tabla 9.2).

Son especialmente interesantes aquellos nanosistemas cuya composición se basa en biomateriales o biopolímeros. La elaboración de nanopartículas a partir de este tipo de materiales garantiza el que se pueda llegar a desarrollar un vehículo biodegradable, biocompatible y potencialmente seguro para su administra-

TABLA 9.2. *Resumen de las diversas aplicaciones de los distintos tipos de sistemas coloidales para la liberación de vacunas.*

Nanosistema	Descripción	Aplicaciones recientes/Referencia
Dendrímeros	Compuesto macromolecular ramificado creado a partir de un núcleo interno.	Dirigidos a los receptores de manosa de las células M al unir un ligando específico (36).
Liposomas	Vesículas artificiales formadas a partir de fosfolípidos y colesterol.	Liposomas catiónicos como sistema adyuvante de vacunas para la malaria (37).
Nanocapsulas	Sistemas vesiculares rodeados por una cubierta polimérica.	Nanoemulsión recubierta de quitosano para inmunización nasal (38).
Micelas poliméricas	Compuestas por polímeros anfifílicos que se asocian en solución acuosa.	Micelas capaces de liberar fármacos de forma selectiva en compartimentos intracelulares (39).
Nanosferas	Sistemas matriciales en los que el fármaco se encuentra uniformemente disperso.	Liberación de plásmidos DNA codificadores de antígeno por vía nasal con NP de PLGA-Poloxamer (40).

ción en humanos. Las nanopartículas poliméricas diseñadas para la liberación de vacunas pueden actuar mediante un mecanismo depot, según el cual el antígeno asociado se va liberando gradualmente de manera sostenida. Además, este tipo de sistemas coloidales ofrecen grandes ventajas para la liberación de vacunas a través de las barreras mucosas, especialmente por la vía oral y nasal, siendo capaces de dar lugar a una respuesta inmunológica sistémica, pero al mismo tiempo a nivel de la mucosa, debido a la importante presencia del sistema inmune en los tejidos asociados a las mucosas (MALT) (42), como por ejemplo, las placas de Peyer a nivel intestinal y el NALT a nivel de las vías respiratorias. Por un lado, las nanopartículas protegen al antígeno encapsulado frente a la degradación enzimática, especialmente tras su administración oral, y por otro lado, pueden promover la captación por la células M del NALT y de las placas de Peyer (43).

El diseño de vehículos nanométricos basados en biomateriales puede ser una solución muy adecuada para superar las barreras biológicas y la baja inmunogenicidad de muchos antígenos, de forma que puedan contribuir en la inducción de la respuesta inmune específica deseada, ofreciendo al mismo tiempo importantes ventajas para aumentar la cobertura inmunológica. Por un lado, debido a sus propiedades para superar barreras biológicas, las nanopartículas poliméricas podrían contribuir enormemente en el diseño de un sistema de vacunación que evite las rutas de administración invasivas (35, 44, 45). Por otro lado, se podría mejorar de forma más efectiva la respuesta inmune en función de la



FIGURA 9.2. *Mecanismos de captación de nanopartículas por las células presentadoras de antígenos.*

aplicación final de la vacuna, mediante la modificación de los distintos mecanismos de activación del sistema inmune innato, como el aumento en la captación o la activación directa de las CPA.

Para ello, diversos mecanismos de activación del sistema inmune innato a través de las CPA (p. ej. las células dendríticas), juegan un papel relevante a la hora de generar una respuesta inmune específica (46). Por tanto, mediante el diseño de un sistema coloidal polimérico se podrían intentar modular dichos mecanismos para conseguir una respuesta adecuada, como se resume a continuación:

La forma en que el antígeno es internalizado y luego liberado intracelularmente es un factor clave para que se llegue a generar una respuesta inmunitaria de células T, como se puede apreciar en la Figura 9.2. Por tanto, al aumentar la internalización y posterior liberación intracelular del antígeno con un sistema nanoparticulado, cabría esperar una mejora en el tipo de respuesta inmune generada.

Algunos biomateriales pueden incluso tener actividad adyuvante por si mismos y actuar como «señales de peligro» para activar los receptores TLR («Toll-like receptors») de las CPA, como por ejemplo los polifosfacenos (47) con lo cual un sistema de liberación de vacunas compuesto por este tipo de biomateriales, podría activar directamente estas células e inducir inmunidad de células T.

Finalmente, mediante la modulación del tamaño de partícula, se puede acceder directamente a las células dendríticas de los ganglios linfáticos en lugar de ser previamente captadas y procesadas por las células dendríticas periféricas. De este modo, la respuesta inmune se generaría directamente en los órganos inductores (48).

El uso de nanopartículas poliméricas para la liberación de vacunas ha sido cada vez mayor en los últimos años. La importancia de estos nuevos vehículos para mejorar la inmunización se ve reflejada en el gran número de sistemas con diversas propiedades que han ido surgiendo, elaborados utilizando una amplia gama de biomateriales y técnicas de preparación, e ideados con la finalidad de generar un vehículo de tamaño nanométrico capaz de acercarse más fácil y eficazmente el antígeno al sistema inmune, al mismo tiempo que pudiese llegar a regular la respuesta inmunológica inducida (19, 25, 35, 43, 44).

### **Interacción de las nanopartículas poliméricas con el sistema inmune - captación por las células presentadoras de antígeno**

Las células dendríticas son unas potentes células presentadoras de antígeno que se encuentran en tejidos periféricos y órganos linfoides. Son capaces de activar a las células B y T e iniciar una respuesta inmune específica. El papel de las células dendríticas inmaduras que se encuentran en los tejidos periféricos es la de reconocer sustancias extrañas y patógenos. Presentan una alta capacidad para captar antígenos y procesarlos mediante la expresión abundante de los complejos mayores de histocompatibilidad tipo I y II (MHC I y II), moléculas coestimuladoras (p. ej. CD80, CD86, CD40) y la secreción de otras moléculas accesorias necesarias, como citoquinas (p. ej. IL-12), quemoquinas (p. ej. CCL19 y CCL22) y la expresión de receptores de citoquinas (p. ej. CCR7), para una eficaz presentación del antígeno (49).

En el caso de los sistemas de liberación de vacunas, es especialmente interesante la capacidad de las nanopartículas poliméricas para ser más eficazmente captadas e internalizadas por las CPA células dendríticas debido a su tamaño nanométrico (50).

Los antígenos particulados, y en concreto los sistemas coloidales poliméricos transportadores de antígeno, pueden ser captados por las células dendríticas a través de diversos mecanismos de endocitosis (51): mediada por receptores (liberación selectiva), macropinocitosis (antígenos solubles), mediada por clatrina o caveolina, y fagocitosis. El que una nanopartícula polimérica se internalice de una u otra manera depende de forma importante de su tamaño, forma, carga y composi-

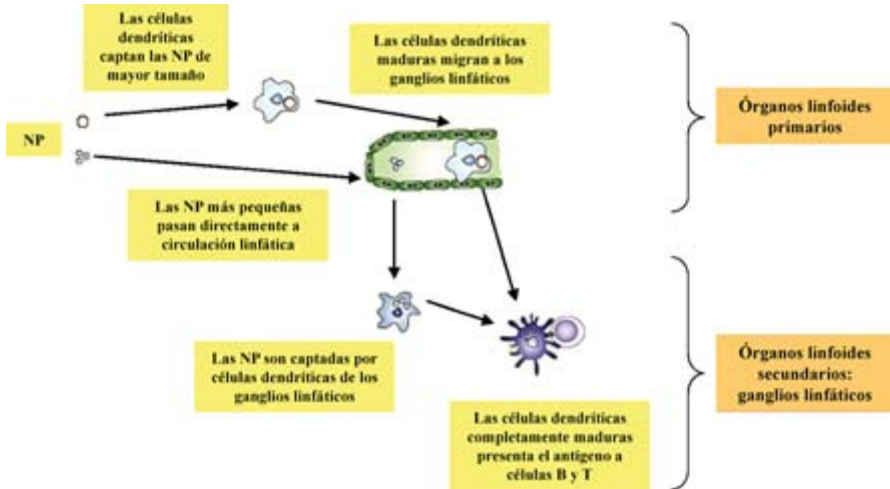


FIGURA 9.3. Captación y procesamiento por la CPA del antígeno transportado por nanopartículas para generar una respuesta inmunológica específica en los ganglios linfáticos.

ción superficial. Una vez internalizada, se incluye en el compartimento endocítico para que el antígeno sea procesado en unidades peptídicas y posteriormente presentado en los MHC clase II a las células T  $CD4^+$  en los órganos linfoides secundarios (Figura 9.3). De esta forma se inicia la inducción de una respuesta inmune específica frente al antígeno presentado. Alternativamente, puede producirse una presentación cruzada del antígeno exógeno mediante el uso de sistemas de liberación particulados a través de MHC clase I. Siguiendo esta ruta de procesamiento el antígeno es presentado a células T  $CD8^+$  para finalmente conseguir una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) (52). Para el desarrollo de vacunas frente a patógenos intracelulares y vacunas terapéuticas este tipo de respuesta celular es especialmente interesante, ya que las CTL son capaces de eliminar patógenos intracelulares y células malignas o apoptóticas.

Aunque una amplia variedad de biomateriales han sido utilizados para el desarrollo de nanopartículas para liberación de vacunas, más recientemente han sido estudiados los sistemas de nanopartículas elaboradas a partir de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (53), gelatina (54), ácido poli-Á-glutámico (55), dendrímeros (36) o protamina (56) para aumentar la captación de antígenos y sustancias inmunoestimulantes por las células dendríticas.

Las nanopartículas de PLGA han sido estudiadas ampliamente como sistemas de liberación de fármacos, proteínas y material genético (50). Sin embargo re-

cientes estudios han demostrado que las nanopartículas de PLGA pueden ser un excelente vehículo para ser captado eficazmente por las células dendríticas. Nanopartículas de PLGA con un tamaño medio de 300 nm (57) son captadas por estas células de forma importante mediante fagocitosis. Al igual que otros sistemas basados en gelatina (58) o poli-Á-glutámico modificado (59) de similar tamaño de partícula (300 nm y 250 nm respectivamente), la mayor captación de los sistemas coloidales por parte de las células dendríticas se manifiesta en su posterior activación y maduración mediante el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC clase II en la superficie celular (51).

La incorporación de una sustancia inmunoestimulante en un sistema coloidal puede ver incrementada su propia capacidad estimuladora al ser reconocida y captada por las células dendríticas en un sistema particulado. Por ejemplo, la encapsulación de MPLA (derivado no tóxico del LPS) en nanopartículas de PLGA provocan una maduración de las células dendríticas mayor que el inmunoestimulante en solución. Por otro lado, estudios similares llevados a cabo con nanopartículas de gelatina y gelatina cationizada elaboradas mediante desolvatación (54), han demostrado incrementar la capacidad inmunoestimuladora del CpG ODN, un oligonucleótido capaz de estimular a las células dendríticas debido a su interacción con el receptor TLR4. De este modo se corrobora la eficacia de estos nanosistemas para ser internalizados por las células dendríticas mejorando el efecto estimulante del CpG ODN. Se aprecia además, cómo diferencias en las propiedades superficiales del sistema afectan a la internalización y maduración de las células dendríticas tanto *in vivo* como *in vitro*, ya que las nanopartículas elaboradas a partir de gelatina cationizada, y por tanto con un potencial  $\zeta$  positivo, han resultado ser más eficazmente captadas que las nanopartículas neutras.

Estudios realizados con nanopartículas de poli-Á-glutámico modificado con aminoácidos hidrofóbicos que dan un carácter anfifílico al polímero, han demostrado que la sola presencia del sistema en el medio contribuye enormemente a la activación de las células dendríticas (55), es decir, la mayor captación del antígeno, en este caso ovalbúmina, y posterior maduración de las células tiene lugar independientemente de que éste se encuentre encapsulado en las nanopartículas o como una mezcla física. Sin embargo, solamente las células dendríticas activadas con las nanopartículas cargadas con el antígeno han sido capaces de estimular una respuesta de células T específica, lo cual se ha atribuido a que la prolongación de la vida media del antígeno encapsulado en el interior celular podría ser un factor determinante en la generación de una respuesta inmune celular.

Así mismo, se ha determinado que las células dendríticas activadas por nanopartículas de PLGA presentan un importante potencial para activar a las células T (53), y por tanto, para inducir una respuesta inmune celular CTL debido a una mayor secreción de citoquinas tipo Th1. Esta característica puede ser especialmente beneficiosa para el desarrollo de una vacuna terapéutica dirigida a la inmunoterapia del cáncer o de enfermedades infecciosas crónicas.

En general, independientemente de los diferentes tipos de biomateriales utilizados, estos vehículos de tamaño nanométrico han sido capaces de interactuar de forma importante con las células dendríticas, de forma que son eficazmente internalizadas dando lugar a su activación, pudiendo incluso incrementar la actividad adyuvante de la sustancia inmunoestimulante asociada. Ello indica que la presentación del antígeno a las células dendríticas en forma particulada con sistemas coloidales mejora notablemente su captación, provocando consecuentemente la maduración de la célula dendrítica y la migración a los órganos linfoides secundarios para poder iniciar una respuesta inmunológica específica. Por tanto, la liberación intracelular del antígeno a las células dendríticas es un factor especialmente importante a la hora de optimizar la respuesta inmune, siendo los sistemas de nanopartículas poliméricas una estrategia muy adecuada para conseguir este objetivo, que por otro lado, permitiría dirigir el antígeno hacia determinadas rutas de procesamiento intracelular llegando incluso a modular la respuesta inmune (60).

## **APLICACIÓN DE LAS NANOVACUNAS A LA INMUNIZACIÓN POR VÍAS MUCOSAS**

El gran éxito alcanzado con la vacunación oral frente a la poliomielitis, utilizando una vacuna basada en el microorganismo atenuado, ha llevado a considerar la vacunación a través de las vías mucosas una posible alternativa para desarrollar sistemas de liberación sin agujas. Las posibles consecuencias de implementar un sistema de este tipo serían, entre otras, la posibilidad de mejorar la cobertura inmunológica global e incrementar el perfil de seguridad de las vacunas al evitar el uso de agujas y jeringas. Igualmente importante, al introducir una forma de vacunación que no requiere inyección, se mejora la aceptación por parte del paciente, incrementado su confianza en las campañas y calendarios de vacunación de forma que se podría mejorar el cumplimiento en las pautas de inmunización (61).

Los antígenos administrados en las vacunas para inmunización están compuestos principalmente por proteínas propias del patógeno, o por plásmidos ADN codificadores de proteínas antigénicas, como se ha descrito previamente. Sin em-

bargo, debido a la baja estabilidad de estas biomoléculas, especialmente en zonas de alto contenido enzimático como el sistema digestivo, su administración se ve restringida a las vías parenterales (subcutánea e intramuscular), para evitar su posible degradación previa al efecto terapéutico. Además, al tratarse principalmente de moléculas de elevado peso molecular y carácter hidrofílico, presentan una limitada capacidad para ser transportadas a través de las barreras biológicas.

Uno de los principales objetivos en el desarrollo de nuevas tecnologías basadas en sistemas coloidales a base de biomateriales, ha sido el de mejorar la estabilidad de macromoléculas terapéuticas (péptidos, proteínas o material genético) en los medios biológicos, así como para mejorar su transporte a través de las barreras biológicas que imponen las diferentes vías de administración no parenterales.

Principalmente, el tamaño nanométrico de estos sistemas favorece enormemente su capacidad para superar las barreras biológicas y transportar la molécula bioactiva hacia el tejido diana donde llevará a cabo su acción farmacológica. Sin embargo, no solo el tamaño de partícula es un factor relevante a la hora de diseñar un nanovehículo para el transporte de macromoléculas a través de vías no invasivas, sino que otras propiedades como la bioadhesividad, la estabilidad en medios biológicos, su composición y propiedades superficiales, influyen de forma crucial en el éxito del nanosistema para superar las barreras biológicas de las superficies mucosas y hacer llegar la molécula terapéutica a su diana (62).

Una amplia variedad de nanosistemas elaborados a partir de diversos biomateriales, tanto de carácter hidrofóbico (PLGA, PLA, PECL) como hidrófilo (quitosano, ácido hialurónico, alginato, glucomanano) han sido utilizados como vehículos de macromoléculas terapéuticas a través de diferentes vías mucosas (63). Sin embargo, aquellos sistemas basados en polímeros hidrofílicos de origen natural, como por ejemplo el quitosano (64, 65), han sido ampliamente estudiados como sistemas de liberación a través de las vías mucosas, debido a que permiten la encapsulación de macromoléculas terapéuticas mediante técnicas más sencillas y en condiciones no agresivas que no requieren del uso de solventes orgánicos ni de la aplicación de elevada energía (p. ej. sonicación, ultrasonidos, etc.), y debido a su aceptable estabilidad en fluidos biológicos y mayor afinidad por las superficies mucosas (62).

La vacunación a través de las vías mucosas ha atraído gran interés en los últimos años debido además a la posibilidad de generar una respuesta inmune específica a nivel de la superficie mucosa. Esta característica es de especial interés de

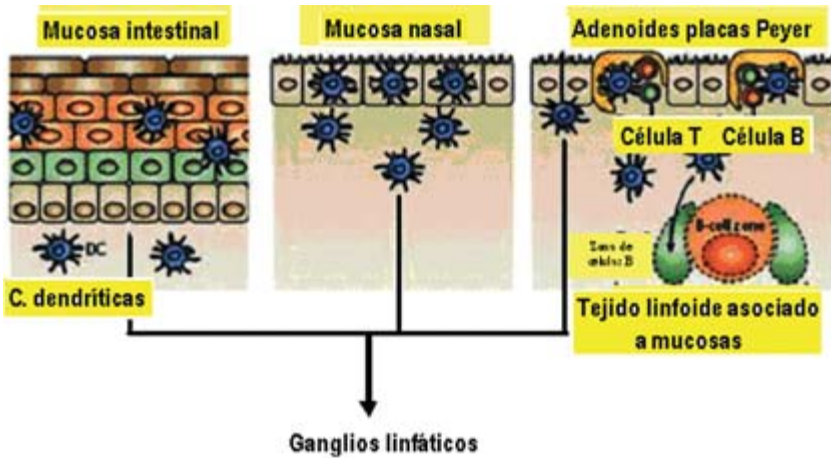


FIGURA 9.4. Representación esquemática de la presencia del sistema inmune en las diferentes superficies mucosas.

bido fundamentalmente a la gran ventaja que ofrece frente a la inmunización parenteral a la hora de generar protección frente a patógenos que accedan al organismo utilizando esta vía de entrada, ya que con la administración parenteral del antígeno no se llega a conseguir este tipo de respuesta a nivel de las mucosas (66).

Las superficies mucosas son altamente ricas en tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT), además de contar con la importante presencia de CPA en la zona submucosa como se puede apreciar en la Figura 9.4. De esta forma, cualquier antígeno liberado y captado por las CPA del MALT y la submucosa, sería capaz de iniciar una respuesta inmune específica tanto a nivel de la mucosa, mediante la secreción de IgA, como a nivel sistémico, con la aparición de IgG en sangre (42). Con lo cual, en primer lugar se crearía una barrera defensiva en dicha zona para minimizar la entrada de microorganismos, al tiempo que se podría llegar a inducir una respuesta inmune sistémica duradera.

Por tanto, la elección de un sistema coloidal para mejorar el transporte de antígenos a través de las superficies mucosas para llegar a los tejidos donde se encuentran las CPA puede ser una buena alternativa a la liberación mediante inyección y para conseguir respuestas inmunitarias a nivel de la mucosa.

En general, la vía oral y la vía nasal son las más comúnmente aceptadas para la liberación de vacunas a través de mucosas debido a su buena aceptación por parte de los pacientes y a sus características favorables para la liberación de antígenos.

## ADMINISTRACIÓN DE NANOVACUNAS POR VÍA ORAL

La captación de fármacos y antígenos transportados en sistemas de liberación particulados en el tracto gastrointestinal puede producirse por diversos mecanismos: a través de las microvellosidades, los macrófagos intestinales, los propios enterocitos o el epitelio de las placas de Peyer, a través de las células M. Sin embargo, la mayoría de las evidencias indican que la absorción, tanto de micropartículas como nanopartículas, se produce principalmente a través de las placas de Peyer. Los principales parámetros que afectan a la captación de sistemas particulados a través del epitelio de las placas de Peyer son el tamaño de partícula, la dosis de partículas administrada, y las características superficiales del sistema como la hidrofobicidad, la carga superficial, y la adición de ligandos dirigidos específicamente hacia las células M (67). De esta forma, la modulación de estas características puede favorecer la captación de los sistemas desarrollados por las placas de Peyer.

A día de hoy, los sistemas mejor estudiados para la liberación de vacunas por vía oral han sido las micropartículas poliméricas, en concreto, las compuestas por PLA o PLGA. Es mucho menor la información que se maneja en cuanto al uso de nanopartículas poliméricas para inducir respuestas inmunológicas tras la administración oral (45). Sin embargo, trataremos de resumir las características de los sistemas nanoparticulados estudiados a día de hoy para la inmunización oral.

El hecho de que este tipo de sistemas interaccionen principalmente con los órganos linfoides asociados a la mucosa intestinal es una de las principales ventajas de la administración de vacunas a través de la vía oral, ya que el antígeno podrá ser liberado directamente al sistema inmune presente en la mucosa intestinal al mismo tiempo que se protege al antígeno frente a la degradación enzimática. Aparte, existen otras posibilidades como la liberación selectiva con ligandos dirigidos a las células M y la incorporación de sustancias adyuvantes para mejorar la respuesta inmune a través de esta vía. Sin embargo, en general, se necesita de una mayor dosis de antígeno para generar una respuesta humoral similar a la conseguida con dosis más bajas a través de otras vías como la nasal, utilizando el mismo vehículo, como se observa en el estudio realizado por Jung y col. (68) con nanopartículas de PLGA modificado con PVA (polivinilalcohol). En este mismo estudio se comprueba además, el efecto del tamaño de partícula tras la administración oral. Coincidiendo con las hipótesis de que el tamaño de partícula llevado al rango nanométrico mejora el paso a través de las barreras mucosas, las nanopartículas de menor tamaño, en este caso de 100 nm,

han sido mejor captadas en el tracto gastrointestinal que los prototipos de mayor tamaño (500 nm y  $> 1 \mu\text{m}$ ) y consecuentemente, la respuesta inmune alcanzada ha sido superior en el caso de las partículas de menor tamaño.

Una posible estrategia para optimizar la interacción de los sistemas coloidales con la mucosa gastrointestinal es mediante la incorporación de un ligando específico, que interactúe directamente con las células M de las placas de Peyer. Por ejemplo, nanopartículas de PLGA encapsulando el antígeno de superficie de la hepatitis B, han sido modificadas con lectina, un ligando específico de las células M. Mediante microscopía confocal, Gupta y col. (69) han demostrado la intensa interacción entre los nanosistemas y las células M, lo que se ve reflejado en una mayor respuesta inmune humoral frente a la hepatitis B cuando se compara con el mismo sistema de nanopartículas que no presenta el ligando específico.

Otra interesante estrategia para mejorar la respuesta inmune tras la inmunización oral ha sido la co-encapsulación del antígeno con un inmunoestimulante. En este caso, nanopartículas de quitosano recubiertas por alginato han demostrado su capacidad para ser captadas por las placas de Peyer sin mostrar signos de toxicidad (70) pudiendo ser *a priori* un buen sistema candidato para la inmunización oral. Sin embargo, ha sido necesaria la co-encapsulación del inmunoestimulador CpG ODN con el antígeno de superficie de la hepatitis B, para incrementar la respuesta inmune humoral y celular a través de esta vía (71). De hecho, se observa que es un factor fundamental el que se produzca una co-liberación simultánea del antígeno con el agente inmunoestimulante para mejorar la respuesta inmune, ya que la administración del CpG ODN en solución con las nanopartículas no es capaz de ejercer una acción inmunoestimuladora suficiente para mejorar la respuesta inmune.

Por lo tanto, la incorporación del antígeno a un sistema de nanopartículas poliméricas podría ser una estrategia adecuada para su liberación a nivel intestinal. Sin embargo, como hemos descrito en este apartado, todavía es necesario optimizar los sistemas desarrollados hasta ahora para conseguir un óptimo candidato para la liberación de vacunas a través de la vía oral.

## ADMINISTRACIÓN DE NANOVACUNAS POR VÍA NASAL

Entre las diferentes posibilidades para la vacunación a través de las superficies mucosas, además de la inmunización oral descrita previamente, la vía nasal es sin duda la opción más prometedora por los siguientes motivos, descritos anteriormente por S.S. Davis (72):

- Es una zona fácilmente accesible, dando lugar a una buena aceptación por el paciente y a la posibilidad de inmunización de grandes grupos poblacionales.
- Se evita el uso de agujas y jeringas.
- Reducida actividad enzimática comparada, por ejemplo, con la vía oral; presenta un epitelio relativamente permeable y amplia superficie de absorción.
- Importante presencia del sistema inmune gracias al tejido linfoide asociado a mucosas (NALT) y la continua vigilancia de las células dendríticas subepiteliales.
- Inducción de respuestas inmunes sistémicas y a nivel de la mucosa.

El principal factor a tener en cuenta durante el desarrollo de una vacuna nasal es que el antígeno administrado pueda llegar a los órganos linfoides inductores que forman parte del NALT y a las células dendríticas que circulan en el área submucosa (Figura 9.5). De esta forma, el antígeno podrá ser captado y procesado por estas células, provocando su maduración y migración a los tejidos linfoides secundarios para presentar el antígeno a las células B y T y llegar a generar una respuesta inmune específica. Es por tanto, un factor crítico la inmunodisponibilidad del antígeno liberado, es decir, es fundamental que éste llegue a las áreas inductoras situadas en la mucosa nasal con el fin de facilitar una interacción inicial con las células dendríticas periféricas. Para ello, se deben superar las diversas barreras biológicas impuestas por la vía nasal: la degradación enzimática, la presencia de mucus que recubre la cavidad nasal y la capa de células epiteliales que recubren la mucosa (35). Teniendo esto en cuenta, mediante la utilización de un sistema de liberación adecuado se podría inducir y mejorar la respuesta inmune alcanzada a través de esta vía promoviendo la captación del antígeno por la células del sistema inmune innato presentes en la zona (20).

Entre las múltiples posibilidades para la liberación del antígeno a través de la vía nasal, diversos tipos de nanosistemas han sido estudiados para conseguir una respuesta inmunológica a través de esta vía y que han sido recientemente revisados (35). Sin embargo, es de especial interés el uso de sistemas nanoparticulados basados en biopolímeros como transportadores de antígenos para conseguir el objetivo final de generar una respuesta inmune protectora y prolongada a través de la vía nasal. En concreto, aquellos basados en poliésteres (PLGA y PLA) y quitosano han sido los más ampliamente estudiados (44). Estos sistemas son especialmente prometedores debido a su demostrada capacidad para proteger las bioma-

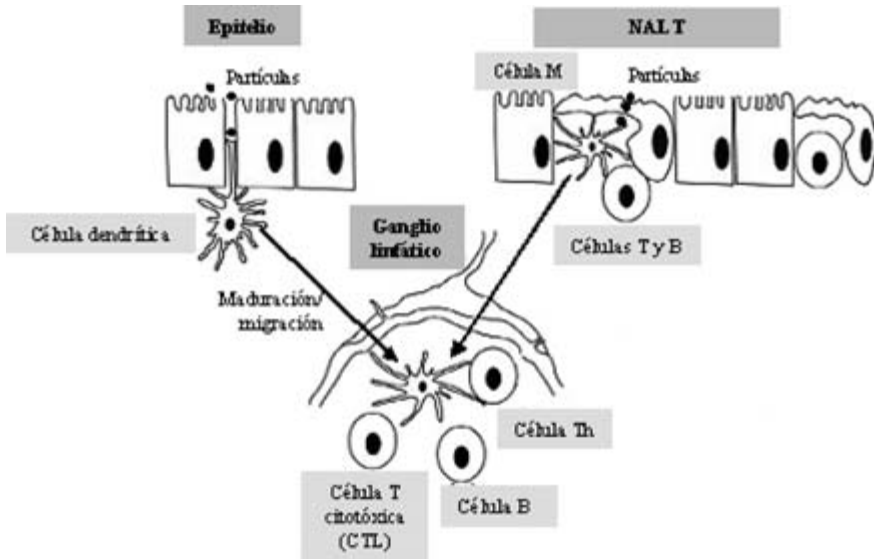


FIGURA 9.5. Representación esquemática de cómo se produce la cascada de activación de la respuesta inmune específica tras la administración nasal de un sistema de liberación particulado.

cromoléculas asociadas, promover la interacción y penetración a través de la mucosa nasal para finalmente conseguir el efecto terapéutico sistémico (40, 73-75).

Las nanopartículas basadas en poliésteres han sido uno de los más prometedores candidatos para la liberación de vacunas a través de la vía nasal. Por ejemplo, resultados obtenidos por Jung y col. (68) indican que la aplicación nasal de nanopartículas de PLGA modificado con PVA reduce la dosis de toxoide tetánico necesario para alcanzar una respuesta inmune, comparando en este caso con la vía digestiva.

Sin embargo, importantes problemas relativos a la inestabilidad del antígeno encapsulado en la matriz polimérica de PLGA y el limitado transporte a través de las superficies mucosas, ha dado lugar a una serie de modificaciones en la estructura de los vehículos con el fin de solventar dichos inconvenientes. Las principales modificaciones que se han llevado a cabo se relacionan con la adición de (i) sustancias estabilizadoras del antígeno y (ii) componentes hidrófilos que mejoren la estabilidad del sistema en los fluidos biológicos y permitan una mejor interacción con la mucosa nasal.

Con la introducción de un polímero anfifílico como el poloxamer en la estructura matricial de las nanopartículas de PLGA (76), se ha conseguido pre-

servar la antigenicidad del toxoide tetánico encapsulado. Siguiendo esta estrategia se ha podido además asociar en nanopartículas formadas por mezclas de PLGA con poloxamer o poloxamina, otro tipo de biomacromoléculas como plásmidos ADN codificadores de antígeno (40). Con estos sistemas se logra que el antígeno ( $\beta$ -galactosidasa) se exprese a partir del material genético encapsulado, tanto *in vitro* como *in vivo*. La inducción de una respuesta inmunológica específica frente a la  $\beta$ -galactosidasa indica que la molécula de ADN ha sido eficazmente transportada a través de la mucosa nasal, lo que ha permitido que se haya expresado el antígeno y consecuentemente, se ha logrado una respuesta inmune específica sistémica.

Por otro lado, se han desarrollado un tipo de nanopartículas que presentan una estructura núcleo-corona, compuestas por un núcleo hidrofóbico de PLA donde se encuentra el antígeno encapsulado, y una cubierta hidrofílica de polietilenglicol (PEG), con el fin de mejorar la estabilidad del sistema en los fluidos biológicos al mismo tiempo que se mejora la interacción con el epitelio nasal (77). Este tipo de sistema ha demostrado ser un vehículo muy adecuado para la liberación tanto de antígenos como de plásmidos ADN codificadores de antígeno a través de la mucosa nasal y llegar a conseguir niveles importantes de IgG específica frente al toxoide tetánico y la  $\beta$ -galactosidasa, respectivamente (78). Una característica interesante de este sistema es que mediante la modificación del tamaño de partícula y la densidad de la cubierta hidrofílica de PEG, se puede optimizar la interacción con la mucosa nasal para incrementar el transporte de la molécula asociada a través de esta vía de administración (79).

La modificación de la superficie de nanopartículas de PLGA con un polímero hidrofílico, como el quitosano, también se ha llevado cabo con la finalidad de incrementar la interacción con la mucosa nasal, debido fundamentalmente a las propiedades bioadhesivas de este polisacárido. En los estudios de biodistribución (75) que se han llevado a cabo tras el marcaje del toxoide tetánico con un radioisótopo, se puede observar una mayor presencia del toxoide en circulación sistémica cuando se administran las nanopartículas recubiertas con quitosano por la vía nasal comparadas con las nanopartículas sin cubierta. Este resultado indica la eficacia de la modificación superficial de las nanopartículas de PLGA con un polímero bioadhesivo para incrementar la interacción del sistema con la mucosa nasal.

Otros sistemas basados en un núcleo hidrofóbico con cubierta de quitosano han sido desarrollados por Nagamoto y col. (38) para la inmunización nasal. En este caso, el sistema consiste en una nanoemulsión, cuyos glóbulos oleosos están formados por aceite de soja estabilizados con lecitina y posteriormente re-

cubiertos por quitosano. Tras la inmunización nasal con partículas que presentan diversos tamaños, los niveles de IgG alcanzados frente a la ovalbúmina asociada al sistema, concluyen que este parámetro no afecta a la respuesta inmune sistémica. Sin embargo, de forma paralela se ha evaluado el comportamiento de las nanopartículas compuestas únicamente por quitosano bajo las mismas condiciones. En este caso se aprecia como las nanopartículas más pequeñas, de 400 nm, consiguen una mejor respuesta inmune a través de la vía nasal que aquellas de tamaño superior (1  $\mu$ m), siendo incluso mayores que la nanoemulsión recubierta. A la vista de estos resultados, los autores llegan a concluir que a pesar de los importantes niveles de IgG alcanzados con la emulsión recubierta por quitosano, las nanopartículas compuestas únicamente por el polisacárido favorecen en mayor medida el transporte del antígeno a través de la mucosa nasal generando una respuesta inmune sistémica mayor.

Con la idea de evaluar los posibles factores que afectan a la eficacia de las nanopartículas de quitosano como sistemas de liberación de antígeno, se ha estudiado el comportamiento de diversos sistemas elaborados mediante gelificación iónica a partir de quitosano de diferente peso molecular (80). Con los diferentes sistemas evaluados, se consigue una respuesta inmune prolongada frente al toxoide tetánico que se incrementa con el tiempo, lo que demuestra que las nanopartículas de quitosano son capaces de facilitar la liberación del antígeno a las CPA a través de la mucosa nasal y generar una importante respuesta inmune específica. Al mismo tiempo se aprecian ciertas diferencias relacionadas con el peso molecular del quitosano que se ha utilizado en cada formulación testada, de forma que tanto los niveles de IgG e IgA han sido significativamente mayores cuando el quitosano presenta un peso molecular superior.

Por otro lado, se han llevado a cabo modificaciones en la molécula de quitosano con la idea de tratar de solventar los inconvenientes asociados a la baja solubilidad del quitosano a pH fisiológico al no encontrarse en su forma completamente protonizada y la disminución de sus propiedades como promotor de la absorción. La modificación más estudiada, y que ya ha sido utilizada para la elaboración de nanopartículas para la liberación mucosa de antígeno, ha sido la adición parcial de grupos metileno en los residuos amina de la molécula de quitosano. El polímero resultante, N-trimetil quitosano (TMC), presenta buena solubilidad en un amplio rango de pH manteniendo las propiedades bioadhesivas del quitosano, al mismo tiempo que permite la preparación de nanopartículas mediante gelificación iónica. Las nanopartículas elaboradas a partir de este derivado del quitosano, han sido evaluadas como vehículos para la inmunización nasal frente a influenza en ratones (81). Se han conseguido con este sistema, ni-

veles importantes de IgG sérica y una fuerte inhibición de la hemaglutinación, junto con niveles significativos de IgA detectados en los lavados nasales, comparados con los alcanzados con el antígeno solo o mezclado en una solución de polímero. Estos resultados se han atribuido principalmente a las propiedades mucoadhesivas del polímero que permiten una exposición más prolongada del antígeno, así como a la naturaleza particulada del sistema que mejora el acceso al NALT y a los ganglios linfáticos.

Por lo tanto, el uso de sistemas de liberación nanométricos basados en biomateriales, han demostrado que pueden mejorar la respuesta inmune frente al antígeno que transportan cuando se administran a través de una vía no invasiva, como es la vía nasal. Los resultados obtenidos hasta hoy con los diferentes nanosistemas evaluados han sido muy prometedores, y se ha demostrado que modificaciones en la estructura de los nanosistemas que lleven a incrementar su estabilidad y/o la interacción con la mucosa nasal favorecen de forma importante el éxito del sistema para alcanzar respuestas inmunes específicas importantes, tanto sistémicas como a nivel de la mucosa.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA FUTURA

En los últimos años el uso de sistemas de liberación de antígenos ha generado gran interés para el desarrollo de nuevas vacunas. Como hemos descrito previamente, el diseño de nuevas formulaciones para mejorar la efectividad de las vacunas ya existentes, supone una estrategia altamente interesante para ampliar la cobertura inmunológica en la población.

La utilización de sistemas de liberación de tamaño nanométrico ha supuesto un nuevo avance en la evolución de las vacunas. El papel de las nanotecnologías en el diseño de nuevas vacunas tiene especial protagonismo cuando se pretende incrementar la interacción del antígeno transportado con las células del sistema inmune innato, pero es igualmente interesante la mejora del transporte de antígenos a través de las superficies mucosas. Efectivamente, las nanopartículas elaboradas a partir de biomateriales han sido ampliamente estudiadas en los últimos tiempos como vehículos de biomacromoléculas para su administración a través de vías no invasivas, como la vía oral y la nasal. De hecho, están demostrando su capacidad para interactuar con la mucosa y las células inmunocompetentes de los tejidos linfoides asociados a mucosas para lograr respuestas inmunitarias a nivel sistémico, pero también, generando protección inmunológica a nivel de la mucosa, como avalan los recientes estudios aquí descritos.

Aunque quedan todavía muchos retos por alcanzar en cuanto al diseño de sistemas coloidales para la liberación de vacunas, se pueden llegar conseguir nuevas y mejoradas vacunas mediante un diseño racional proporcionado por el conocimiento multidisciplinar, gracias a los grandes avances en la identificación de dianas inmunológicas y el creciente desarrollo de las nanotecnologías como alternativa para la liberación de vacunas.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Plotkin, S.A. (1994) *Vaccines*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.
- (2) Liu, M.A. (2003) DNA vaccines: a review. *J. Intern. Med.* 253: 402-410.
- (3) Movahedi, A.R. & Hampson, D.J. (2008) New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. *Vet. Microbiol.* 131(1-2): 1-13.
- (4) Plotkin, S.A. (2005) Vaccines: past, present and future. *Nat. Med.* 11(4 (suppl)): S5-11.
- (5) Bramwell, V.W. & Perrie, Y. (2005) The rational design of vaccines. *Drug Discov. Today.* 10(22): 1527-1534.
- (6) McCullers, J.A. (2007) Evolution, benefits, and shortcomings of vaccine management. *J. Manag. Care Pharm.* 13(7, S-b): S2-S6.
- (7) O'Hagan, D.T. & Rappuoli, R. (2004) The safety of vaccines. *Drug Discov. Today.* 19: 846-854.
- (8) Duclos, P. (2004) A global perspective on vaccine safety. *Vaccine.* 22: 2059-2063.
- (9) Barouch, D.H. (2006) Rational design of gene-based vaccines. *J. Pathol.* 208: 283-289.
- (10) Friede, M. & Aguado, M.T. (2005) Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 57: 325.
- (11) Simonsen, L., Kane, A., Lloyd, J., Zaffran, M. & Kane, M. (1999) Unsafe injections in the developing world and transmission of bloodborne pathogens: a review. *B World Health Organ.* 77(10): 789-800.
- (12) Jodar, L., Duclos, P., Milstien, J., Griffiths, E., Aguado, M.T. & Clements, C.J. (2001) Ensuring vaccine safety in immunization programmes - a WHO perspective. *Vaccine.* 19: 1594-1605.
- (13) Drain, P.K., Nelson, C.M. & Lloyd, J.S. (2003) Single-dose versus multi-dose vials for immunization programmes in developing countries. *B World Health Organ.* 81(10): 726-731.

- (14) Clements, C.J., Larsen, G. & Jodar, L. (2004) Technologies that make administration of vaccines safer. *Vaccine*. 22: 2054-2058.
- (15) Matthias, D.K., Robertson, J., Garrison, M.M., Newland, S. & Nelson, C. (2007) Freezing temperatures in the vaccine cold chain: A systematic literature review. *Vaccine*. 25: 3980-3986.
- (16) Zapata, M.I., Peck, G.E., Hem, S.L., White, J.L. & Feldkamp, J.R. (1984) Mechanism of freeze-thaw instability of aluminum hydroxycarbonate and magnesium hydroxide gels. *J. Pharm. Sci.* 73: 3-9.
- (17) Galazka, A., Milstien, J.B. & Zaffran, M. (1998) Thermostability of vaccines. 1.<sup>a</sup> ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- (18) Edwards, K.M. & Decker, M.D. (1997) Combination vaccines consisting of acellular pertussis vaccines. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16(4): S97-S102.
- (19) Ryan, E.J., Daly, L.M. & Mills, K.H.G. (2001) Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol.* 19(8): 293-303.
- (20) O'Hagan, D.T. & Rappuoli, R. (2004) Novel approaches to vaccine delivery. *Pharm. Research*. 21(9): 1519-1529.
- (21) Clements, C.J. & Griffiths, E. (2002) The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. *Vaccine*. 20: S24-S33.
- (22) Lindbald, E.B. (2004) Aluminium adjuvants - in retrospect and prospect. *Vaccine*. 22: 3658-3668.
- (23) Puig-Barberà, J., Díez-Domingo, J., Belenguer Varea, A., Schwarz Chavarri, G., Lluch Rodrigo, J.A., Pérez Hoyos, S., et al. (2007) Effectiveness of MF59TM-adjuvanted subunit influenza vaccine in preventing hospitalisations for cardiovascular disease, cerebrovascular disease and pneumonia in the elderly. *Vaccine*. 25: 7313-7321.
- (24) O'Hagan, D.T. & Rappuoli, R. (2006) Novel approaches to pediatric vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 58: 29-51.
- (25) Moingeon, P., De Taisne, C. & Almond, J. (2002) Delivery technologies for human vaccines. *Brit. Med. Bull.* 62: 29-44.
- (26) Moingeon, P., Haensler, J. & Lindberg, A. (2001) Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine*. 19(31): 4363-4372.
- (27) Preis, I. & Langer, R. (1979) A single-step immunization by sustained antigen release. *J. Immunol. Methods*. 28: 193-197.
- (28) Aguado, M.T. (1993) Future approaches for vaccine development - single-dose vaccines using controlled-release delivery systems. *Vaccine*. 11(5): 596-597.

- (29) Tobio, M., Schwendeman, S.P., Guo, Y., McIver, J., Langer, R. & Alonso, M.J. (2000) Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system. *Vaccine*.18: 618-622.
- (30) Jaganathan, K.S. & Vyas, S.P. (2006) Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine*. 24: 4201-4211.
- (31) Feng, L., Qi, X.R., Zhou, X.J., Maitani, Y., Wang, S.C., Jiang, Y. et al. (2006) Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J. Control. Release*. 112: 35-42.
- (32) Davis, S.S. (2006) The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine responses after parenteral and mucosal delivery. *Vaccine*. 24(S2): 7-10.
- (33) Alonso, M.J., Cohen, S., Park, T.G., Gupta, R.K., Siber, G.R. & Langer, R. (1993) Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharm. Research*. 10(7): 945-953.
- (34) Sánchez, A., Gupta, R.K., Alonso, M.J., Siber G.R. & Langer, R. (1996) Pulsed controlled-release system for potential use in vaccine delivery. *J. Pharm. Sci.* 85(6): 547-552.
- (35) Csaba, N., García-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2008) Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliver. Rev.* Dec 13.
- (36) Sheng, K., Kalkanidis, M., Pouniotis, D.S., Esparon, S., Tang, C.K., Apostolopoulos, V. et al. (2008) Delivery of antigen using a novel mannosylated dendrimer potentiates immunogenicity in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* 38: 424-436.
- (37) Vangala, A., Kirby, D., Rosenkrands, I., Agger, E.M., Andersen, P. & Perrie, Y. (2006) A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant system for protein subunit vaccines: characterization, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 58(6): 787-799.
- (38) Nagamoto, T., Hattori, Y., Takayama, K. & Maitani, Y. (2004) Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing response via intranasal vaccine delivery. *Pharm. Research*. 21(4): 671-674.
- (39) Seow, W.M., Xue, J.M. & Yang, Y.Y. (2007) Targeted and intracellular delivery of paclitaxel using multi-functional polymeric micelles. *Biomaterials*. 28(9): 1730-1740.
- (40) Csaba, N., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2006) PLGA: poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J. Control. Release*. 113(2): 164-172.

- (41) Orive, G., Gascón, A.R., Hernández, R.M., Domínguez-Gil, R.A. & Pedraz, J.R. (2004) Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. *Trends Pharmacol. Sci.* 25(7): 382-387.
- (42) Neutra, M.R. & Kozlowski, P.A. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 148-158.
- (43) Peek, L.J., Middaugh, C.R. & Berkland, C. (2008) Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver Rev.* 60: 915-928.
- (44) Köping-Högard, M., Sánchez, A. & Alonso, M.J. (2005) Nanoparticles as carriers for nasal vaccine delivery. *Expert Rev. Vaccines.* 4(2): 185-196.
- (45) Des Rieux, A., Fievez, V., Garinot, M., Schneider, Y.J. & Prétat, V. (2006) Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J. Control. Release.* 116: 1-26.
- (46) Reddy, S.T., Swartz, M.A. & Hubbell, J.A. (2006) Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 27(12): 573-579.
- (47) Mutwiri, G., Benjamin, P., Soita, H., Townsend, H., Yost, R., Roberts, B., et al. (2007) Poly[di(sodium carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens. *Vaccine.* 25: 1204-1213.
- (48) Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P. & Bachmann, M.F. (2008) Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *J. Immunol.* 38: 1404-1413.
- (49) Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673): 245-252.
- (50) Panyam, J. & Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cell and tissue. *Adv. Drug Deliver Rev.* 55: 329-347.
- (51) Xiang, S.D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P.L., et al. (2006) Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods.* 40: 1-9.
- (52) Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. (1995) A phagosome-to-cytosol pathway or exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 267(5195): 243-246.
- (53) Elemanchili, P., Lutsiak, C.M., Hamdy, S., Diwan, M. & Samuel, J. (2007) «Pathogen-mimicking» nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J. Immunother.* 30(4): 378-395.
- (54) Zwiorek, K., Bourquin, C., Battiany, J., Winter, G., Endres, S., Hartmann, G., et al. (2008) Delivery of cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm. Research.* 25(3): 551-562.

- (55) Wang, X., Uto, T., Akagi, T., Akashi, M. & Baba, M. (2008) Poly(Á-glutamic acid) nanoparticles as an efficient antigen delivery and adjuvant system: potential for an AIDS vaccine. *J. Med. Virol.* 80: 11-19.
- (56) Kerkmann, M., Lochmann, D., Weyermann, J., Marschner, A., Poeck, H., Wagner, M. et al. (2006) Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles. *Oligonucleotides.* 26: 313-322.
- (57) Elemanchili, P., Diwan, M., Cao, M. & Samuel, J. (2004) Characterization of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine.* 22: 2406-2412.
- (58) Coester, C., Nayyar, P. & Samuel, J. (2006) In vitro uptake of gelatin nanoparticles by murine dendritic cells and their intracellular localisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62: 306-314.
- (59) Akagi, T., Wang, X., Uto, T., Baba, M. & Akashi, M. (2007) Protein direct delivery to dendritic cells using nanoparticles based on amphiphilic poly(amino acid) derivatives. *Biomaterials.* 28: 3427-3426.
- (60) Dobrovolskaia, M.A. & McNeil, S.E. (2007) Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2(8): 469-478.
- (61) Guidice, E.L. & Campbell, J.D. (2006) Needle-free vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver Rev.* 58: 68-89.
- (62) De la Fuente, M., Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. & Alonso, M.J. (2008) Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. *Nanomed.* 3(6): 845-857.
- (63) Alonso, M.J. (2004) Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.* 58: 168-172.
- (64) Prego, C., García, M., Torres, D. & Alonso, M.J. (2005) Transmucosal macromolecular drug delivery. *J. Control. Release.* 101: 151-162.
- (65) Janes, K.A., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliver Rev.* 47: 83-97.
- (66) Holmgren, J. & Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* 11(4): S45-S53.
- (67) O'Hagan, D.T. (1996) The intestinal uptake and the implications for drug and antigen delivery. *J. Anat.* 189: 447-482.
- (68) Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Hungerer, K.D., Hundt, E. & Kissel, T. (2001) Tetanus toxoid loaded nanoparticles from sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide): evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Research.* 18(3): 352-360.

- (69) Gupta, P.N., Khatri, K., Goyal, A.K., Mishra, N. & Vyas, S.P. (2007) M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. *J. Drug Target.* 15(10): 701-713.
- (70) Borges, O., Cordeiro-da-Silva, A., Romeijn, S.G., Amidi, M., De Sousa, A., Borchard, G., et al. (2006) Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. *J. Control. Release.* 114: 348-358.
- (71) Borges, O., Tavares, J., De Sousa, A., Borchard, G., Junginger, H.E. & Cordeiro-da-Silva, A. (2007) Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32(4-5): 278-290.
- (72) Davis, S.S. (2001) Nasal vaccines. *Adv. Drug Deliver Rev.* 51: 21-42.
- (73) Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Research.* 16(10): 1576-1581.
- (74) Prego, C., Torres, D. & Alonso, M.J. (2006) Chitosan nanocapsules: a new carrier for nasal peptide delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Tec.* 16(5): 331-337.
- (75) Vila, A., Sánchez, A., Tobío, M., Calvo, P. & Alonso, M.J. (2002) Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release.* 78(1-3): 15-24.
- (76) Tobio, M., Nolley, J., Guo, Y., McIver, J. & Alonso, M.J. (1999) A novel nanosystem based on a poloxamer/PLGA blend as a tetanus toxoid delivery vehicle. *Pharm. Research.* 16: 682-688.
- (77) Tobio, M., Gref, R., Sánchez, A., Langer, R. & Alonso, M.J. (1998) Stealth PLA-PEG nanoparticles as nasal protein delivery systems. *Pharm. Research.* 15(270): 275.
- (78) Vila, A., Sánchez, A., Pérez, C. & Alonso, M.J. (2002) PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA. *Polym. Advan. Technol.* 13: 851-858.
- (79) Vila, A., Gill, H., McCallion, O. & Alonso, M.J. (2004) Transport of PLA-PEG particles across the nasal mucosa: effect of particle size and PEG coating density. *J. Control. Release.* 98: 231-244.
- (80) Vila, A., Sánchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Vila-Jato, J.L., et al. (2004) Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57: 123-131.
- (81) Amidi, M., Romeijn, S.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., Bungener, L., Hunkriede, A., et al. (2007) N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in mouse model. *Vaccine.* 25(1): 144-153.